

09/701243

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No. :

JC01 Rec'd PCT/PTO 27 NOV 2000

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/FR99/01247

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below;

That I am knowledgeable in the French language in which the below identified international application was filed, and that, to the best of my knowledge and belief, the English translation of the international application No. PCT/FR99/01247 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date: 8 November 2000



Full name of the translator :

Elaine Patricia PARRISH

For and on behalf of RWS Group plc

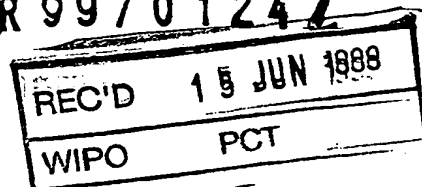
Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,
Gerrards Cross, Buckinghamshire,
England.

14-00000-00

NO. 100-100000-00

THIS PAGE BLANK (USPTO)



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **31 MAI 1999**

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES 27 MAI 1998 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 98 06866 - DEPARTEMENT DE DÉPÔT L7 DATE DE DÉPÔT 27 MAI 1998		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET GERMAIN & MAUREAU B.P. 6153 69466 LYON CEDEX 06	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> diffère <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non Titre de l'invention (200 caractères maximum) PROCEDE D'AMPLIFICATION D'AU MOINS UNE SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE PARTICULIERE ET AMORCES DE MISE EN OEUVRE		n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone MD/MK/B05B3145 04 72 69 84 30	
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination BIO MERIEUX Nationalité (s) FRANCAISE Adresse (s) complète (s) Chemin de l'Orme 69280 MARCY L'ETOILE		code APE-NAF Forme juridique S.A. Pays FRANCE	
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission			
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande			
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date			
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire) Dominique GUERRE CPI 921104		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI A. CHAPELAIN	

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 06 866

TITRE DE L'INVENTION :

Procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière
et amorces de mise en oeuvre

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET GERMAIN & MAUREAU
B.P. 6153
69466 LYON CEDEX 06
FRANCE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

MOUGIN Bruno
29 rue Lamartine
69003 LYON

LAAYOUN Ali
Triangle Fleuri
1 rue du Rhône
69007 LYON

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Lyon, le 27 mai 1998

~~Dominique GUERRE~~
CPI 921104

DESCRIPTION

La présente invention concerne un nouveau procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière d'un acide nucléique de synthèse ou naturel contenu dans un mélange réactionnel. Elle concerne également des amorces permettant une telle amplification.

L'état de la technique décrit des méthodes permettant d'amplifier des séquences nucléotidiques utilisant des amorces spécifiques de ces séquences à amplifier. Ainsi on peut amplifier un gène ou une famille de gènes au sein d'une préparation d'acides nucléiques. De nombreuses techniques utilisent des oligonucléotides complémentaires de la séquence cible servant d'amorces pour l'élongation par une polymérase.

Pour l'amplification des ADN, il existe la PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159, la LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-A-0.201.184, ou la RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069.

Pour l'amplification des ARN, plusieurs techniques ont aussi été décrites dans différents documents. Ces techniques sont les suivantes :

- 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995,*
- NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818,*
- SPSR (Single Primer Sequence Replication) avec le brevet US-A-5,194,370, et*
- TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491.*

Cependant, ces techniques imposent un choix rigoureux des amorces d'amplification. En effet, des amorces peu spécifiques de la séquence d'intérêt vont permettre l'amplification de nombreuses séquences apparentées sur lesquelles elles se seront fixées. L'amplicon correspondant à la séquence d'intérêt se retrouvera donc dilué dans un mélange d'amplicons, ce qui ne facilitera pas l'utilisation de ce produit d'amplification. Dans ces conditions, s'impose alors le choix rigoureux d'une région de

la séquence nucléotidique qui soit suffisamment spécifique pour permettre de produire une amorce complémentaire tout aussi spécifique. Toutefois, d'autres problèmes peuvent apparaître lors du choix de la séquence à utiliser pour l'hybridation de l'amorce. En effet, il arrive que la région réellement spécifique soit unique et se trouve à l'intérieur de la séquence d'intérêt. Le choix d'hybrider une amorce au niveau d'une telle région implique de n'obtenir qu'une fraction plus ou moins importante de ladite séquence d'intérêt. On a donc une perte d'information. De plus, l'obtention d'une amorce spécifique de la séquence nucléotidique d'intérêt apporte un surcroît important de difficulté et de travail.

Avec la présente invention, on s'affranchit des risques d'obtention de produits d'amplification tronqués et des difficultés à obtenir des amorces spécifiques de la séquence nucléotidique à amplifier, puisqu'il est possible d'amplifier spécifiquement la séquence nucléotidique d'intérêt dans des conditions d'hybridation classiques.

Pour ce faire, on utilise deux types d'amorces complémentaires, d'une part, un type d'amorces qui s'hybride indifféremment sur toutes les séquences nucléotidiques apparentées et, d'autre part, un type d'amorces où chaque amorce s'hybride sur une seule de ces séquences apparentées. Les premières, qui sont non-spécifiques, vont servir d'amorces pour l'élongation, les secondes, spécifiques de séquences nucléotidiques apparentées à la séquence d'intérêt, vont servir d'amorces de blocage de l'élongation de certaines de ces séquences nucléotidiques apparentées.

Dans le cas où on utilise un mélange d'amorces non spécifiques et spécifiques, selon le choix du type de séquences spécifiques utilisées, on peut empêcher l'élongation de certaines séquences non spécifiques. Il est alors possible de sélectionner les amplicons que l'on obtient.

Ainsi, on peut bloquer l'amplification de certaines séquences apparentées que l'on ne souhaite pas amplifier, par l'intermédiaire d'un ajout de séquences complémentaires, spécifiques de ces séquences apparentées, séquences complémentaires spécifiques qui font office d'amorces de blocage. Ainsi on isole la ou

les séquences d'intérêt qui va ou vont être amplifiées sélectivement. On obtient donc un seul amplicon pour chaque séquence d'intérêt pour laquelle aucune amorce de blocage n'a été ajoutée.

A cet effet, la présente invention concerne un procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière d'un acide nucléique de synthèse ou naturel contenu dans un mélange réactionnel, le mélange réactionnel étant constitué d'au moins un acide nucléique comportant au moins deux séquences nucléotidiques apparentées et/ou d'au moins deux acides nucléiques comportant chacun au moins une séquence nucléotidique apparentée : le procédé utilisant au moins un type d'amorces d'amplification capables de s'hybrider avec l'acide nucléique pour permettre l'amplification des séquences nucléotidiques apparentées, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter, dans le mélange réactionnel, au moins une séquence, faisant office d'amorce de blocage, qui est capable :

- de s'hybrider à au moins une séquence nucléotidique, qui n'est pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier, et
- d'empêcher à son niveau l'élongation de l'amorce d'amplification.

Préférentiellement, la ou les amorces de blocage sont capables de s'hybrider à la ou à toutes les séquences nucléotidiques, qui ne sont pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier.

Premièrement, dans le cas d'une amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification, tel que décrit ci-dessus, chaque amorce de blocage est un oligonucléotide à base de désoxyribonucléotides et/ou de ribonucléotides et/ou de nucléotides modifiés, tels que des PNA ou des nucléotides thiophosphates.

Deuxièmement, dans le cas d'une amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification, tel que décrit ci-dessus, chaque amorce de blocage comporte au moins un élément qui empêche l'amplification.

Ainsi, l'élément, qui empêche l'amplification, est situé à l'extrémité 3' de l'amorce de blocage et ne permet pas son élongation.

De plus, un autre élément, qui empêche l'amplification, est situé à l'extrémité 5' de l'amorce de blocage et fait office d'élément protecteur.

Chaque élément, qui empêche l'amplification, est constitué :

- soit par un nucléotide ou nucléotide modifié ou par un oligonucléotide comportant ou non au moins un nucléotide modifié ; le nucléotide, le nucléotide modifié ou l'oligonucléotide ne s'hybride pas sur l'acide nucléique.
- 5 - soit par une molécule, différente d'un nucléotide ou d'un nucléotide modifié.

Dans ce cas, l'élément est constitué par au moins cinq, notamment au moins dix et préférentiellement au moins quinze nucléotides, nucléotides modifiés ou un mélange de nucléotide(s) et de nucléotide(s) modifié(s).

10 Selon un premier mode de réalisation et dans le cas où l'élément est constitué par un nucléotide ou nucléotide modifié ou par un oligonucléotide comportant ou non au moins un nucléotide modifié ; le nucléotide, le nucléotide modifié ou l'oligonucléotide ne s'hybride pas sur l'acide nucléique, l'élément est suffisamment long pour permettre la formation d'une boucle et d'une hybridation entre les nucléotides et/ou les nucléotides modifiés, qui constituent cette boucle

15 Selon un second mode de réalisation et dans le cas où l'élément est constitué par un nucléotide ou nucléotide modifié ou par un oligonucléotide comportant ou non au moins un nucléotide modifié ; le nucléotide, le nucléotide modifié ou l'oligonucléotide ne s'hybride pas sur l'acide nucléique, l'élément est constitué d'une " queue " de polynucléotides et/ou de polynucléotides modifiés, qui comporte tous les mêmes bases.

20 Dans le cas d'une amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification comportant un élément qui ne permet pas l'élongation, l'élément est substitué à l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle ou au groupement hydroxyle, placé en position 3' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 3' de l'acide nucléique.

25 Dans le cas d'une amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification comportant, en plus, un élément protecteur, l'élément est :

- substitué au phosphate placé en position 5' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 5' de l'acide nucléique, ou
- greffé sur le phosphate, placé en position 5' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 5' de l'acide nucléique.

Les figures ci-jointes sont données à titre d'exemple explicatif et n'ont aucun caractère limitatif.

La figure 1 représente une vue schématique de principe d'une amplification d'un brin d'acide nucléique et de son brin complémentaire par l'intermédiaire de deux amorces, dans ce cas qui est le plus simple, il y a une amorce par brin.

La figure 2 représente une vue schématique de principe d'une amplification selon la figure 1 mais utilisant la technique exposée par la présente invention.

La figure 3 représente les différentes substitutions qui peuvent être réalisées sur les nucléotides de l'amorce de blocage où :

- R1 est un élément qui se trouve à l'extrémité 3' de l'amorce bloquante et qui empêche toute élongation lors de l'amplification,
- R2 est un élément qui peut se trouver sur au moins une des positions 2' du ribose d'un nucléotide de l'amorce bloquante et qui renforce la stabilité du duplex amorce bloquante - acide nucléique, et
- R3 est un élément qui se trouve à l'extrémité 5' de l'amorce bloquante et qui fait office d'élément protecteur.

La figure 4 représente le positionnement de l'élément R1 à l'extrémité 3' de l'amorce de blocage lorsque ladite amorce est hybridée à l'acide nucléique.

La figure 5 représente le positionnement de l'élément R3 à l'extrémité 5' de l'amorce de blocage lorsque ladite amorce est hybridée à l'acide nucléique.

La figure 6 représente le duplex amorce de blocage - acide nucléique où X représente un nucléotide de l'amorce de blocage comportant l'élément R2 qui renforce la stabilité du duplex, en position sur le ribose de ce nucléotide.

La figure 7 représente différentes structures qui, par ajout en position 3' de l'amorce bloquante, empêche toute élongation lors de l'amplification.

La figure 8 représente différentes structures qui, par ajout en position 5' de l'amorce bloquante, en complément des modifications en position 3', telles que représentées à la figure 3, font office d'élément protecteur en empêchant la dégradation ou l'éjection de l'amorce de blocage lors de l'amplification.

La figure 9 représente l'électrophorégramme correspondant au résultat de la réaction de séquence d'un échantillon d'ADN d'une lignée lymphoblastoïde HLA-DRB1*1301 et HLA-DRB3*01, observé pour la région codant pour les acides aminés 56 à 65 (selon la nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB sans utilisation d'amorce bloquante.

La figure 10 représente l'électrophorégramme correspondant au résultat de la réaction de séquence d'un échantillon d'ADN d'une lignée lymphoblastoïde HLA-DRB1*1301 et HLA-DRB3*01, observé pour la région codant pour les acides aminés 56 à 65 (selon la nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB avec utilisation d'un oligonucléotide 5'-phosphate / 3'-C₆-NH₂ inhibant l'amplification du gène HLA-DRB3.

La figure 11 représente l'électrophorégramme correspondant au résultat de la réaction de séquence d'un échantillon d'ADN d'une lignée lymphoblastoïde HLA-DRB1*0901 et HLA-DRB4*01, observé pour la région codant pour les acides aminés 29 à 47 (selon la nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB sans utilisation d'amorce bloquante.

La figure 12 représente l'électrophorégramme correspondant au résultat de la réaction de séquence d'un échantillon d'ADN d'une lignée lymphoblastoïde HLA-DRB1*0901 et HLA-DRB4*01, observé pour la région codant pour les acides aminés 29 à 47 (selon la nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB avec utilisation d'un oligonucléotide 5'-acridine / 3'-H inhibant l'amplification du gène HLA-DRB4.

La figure 13 représente une vue schématique de principe d'une amplification sélective d'un gène dans une famille de gènes apparentés localisé sur un même chromosome.

La présente invention concerne donc, entre autre, l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques modifiées en leurs extrémités, pour l'amplification sélective de gènes.

L'invention concerne également une méthode utilisant des amorces oligonucléotidiques modifiées, pour l'amplification sélective de certains gènes présents dans un ensemble de gènes apparentés.

5 L'analyse de gènes d'intérêt est facilitée par l'utilisation de techniques d'amplification génique, qui permettent de préparer à partir d'un échantillon biologique, des quantités de matériel spécifique aisément analysable avec les techniques classiques de biologie moléculaire. Ainsi, l'emploi d'amorces oligonucléotidiques, bornant une région génique, conduit à l'obtention d'un mélange de molécules nucléotidiques
10 considérablement enrichi en la molécule d'intérêt, qui devient alors facilement détectable par des techniques d'analyse électrophorétique ou des techniques d'hybridation moléculaire. L'efficacité de cette approche réside dans l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques spécifiques des régions géniques à analyser. Ces amorces doivent donc être des séquences oligonucléotidiques capables de s'hybrider
15 sélectivement avec les séquences nucléiques d'intérêt, présentes dans l'échantillon.

L'analyse de gènes membres de familles de gènes structurellement proches, peut cependant être parfois délicate. La recherche de régions nucléotidiques uniques pour un gène donné permet d'atteindre la spécificité recherchée, mais cette approche peut
20 parfois s'avérer être difficile voire impossible.

La présente invention consiste donc à combiner l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques spécifiques pour l'amplification d'un ensemble limité de gènes structurellement proches, et d'amorces oligonucléotidiques modifiées capables de
25 bloquer spécifiquement les gènes indésirables. En fait, à chaque type de ces amorces modifiés correspond un seul type de gène indésirable.

Cette stratégie permet de simplifier l'analyse de gènes en mélange, par détermination de leur séquence nucléotidique (par séquençage en gel par exemple ou par séquençage par hybridation multiple - DNA Chip -) ou par l'analyse de mutations.
30

L'invention revendique l'utilisation de mélanges d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification effective de régions nucléiques correspondantes, et d'amorces nucléotidiques bloquantes, chevauchantes ou situées en aval (par rapport à l'amorce nucléotidique permettant l'amplification), constituées d'oligonucléotides ne pouvant
5 servir de séquences initiatrices pour l'élongation et donc pour l'amplification des séquences en aval.

Ainsi, pour un gène ou un allèle indésirable, l'amorce non bloquante et l'amorce bloquante s'hybrident sur le même brin pour une polarité d'amorce donnée (amorces 5' en amont, ou amorces 3' en aval de la région à analyser). L'amorce non bloquante, si
10 elle parvient à s'hybrider sur le brin à amplifier, ne peut générer des amplicons au-delà de la région correspondant au site d'hybridation de l'amorce bloquante, rendant inefficace l'amplification correspondant à l'amorce non bloquante. Ce principe, illustré sur les figures 1, 2 et 13, concerne le fonctionnement des amorces bloquantes et des
15 amorces non bloquantes.

Selon la figure 1, on réalise une amplification avec amorces non bloquantes P1 et P2. De manière tout à fait classique, l'extension des amorces P1 et P2 s'opère et de multiples amplicons A sont obtenus.

Selon la figure 2, on reprend exactement la figure 1, puisqu'il s'agit d'une
20 amplification avec amorces non bloquantes P1 et P2. Néanmoins sur le brin complémentaire et en aval de la progression de l'élongation de l'amorce P1, on ajoute une séquence, faisant office d'amorce de blocage P1b, qui est capable de s'hybrider sur le brin complémentaire, et d'empêcher l'amplification à son niveau. Dans ce cas de figure, il n'y aura aucun amplicon produit.

25 Selon la figure 13, on reprend exactement les figures 1 et 2 puisqu'il s'agit d'une amplification sélective du gène G₂ par blocage des gènes apparentés G1 et G3 par des amorces bloquantes spécifiques et des amorces d'amplification non spécifiques.

L'invention revendique l'utilisation d'amorces de blocage comprenant des
30 nucléotides modifiés. Ce principe est illustré sur les figures 3 à 6.

Selon la figure 3, le nucléotide peut être modifié sur les positions 2' ou 3' du ribose, au niveau de l'extrémité 3' de l'oligonucléotide et sur la position 5' du ribose au niveau de l'extrémité 5' dudit oligonucléotide.

5 Selon la figure 4, le groupement R1 substitue, en position 3' du ribose, l'hydroxyle et permet d'empêcher l'élongation de l'extrémité 3' de l'amorce par la polymérase, lorsque le duplex acide nucléique - amorce bloquante est formé.

10 Selon la figure 5, le groupement R3 substitue, en position 5' du ribose, le phosphate et permet de protéger l'amorce bloquante d'une dégradation de l'extrémité 5' et/ou d'un déplacement de l'amorce bloquante, lors de l'élongation de l'amorce d'amplification.

15 Selon la figure 6, le duplex acide nucléique - amorce bloquante peut être renforcé par substitution de l'hydroxyle ou de l'hydrogène en position 2' du ribose, cette substitution pouvant se faire sur plusieurs nucléotides de l'amorce bloquante. Le groupement R2 peut être, par exemple, un radical 2' O-méthyle, qui stabilise les duplex ADN - ARN, en créant une interaction de type hydrophobe.

La stratégie revendiquée trouve de multiples applications chaque fois qu'un mélange de séquences apparentées est à analyser : génétique humaine ou animale, analyses d'agents infectieux (virus, bactéries, parasites,...)

20 A titre d'exemple, des applications dans le domaine du typage HLA (pour Human Leukocyte Antigens) sont décrites ci-après.

Ainsi, le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) comprend un ensemble de gènes situés sur le chromosome 6 chez l'homme, impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire (Bodmer et al. *Nomenclature for factors of the HLA system*, 1996, 25 Tissue Antigens, 1997, 49, 297-321). Un très grand polymorphisme est observé pour ces gènes, et un jeu bien particulier de versions (ou allèles) de chacun de ces gènes est observé pour chaque individu. Il est important de noter que tout individu possède deux allèles de chaque gène, hérités l'un de la mère, l'autre du père.

30 Au sein de cet ensemble de gènes du CMH plus couramment nommés "gènes HLA", certains sont désormais bien connus, tant leur séquence nucléique que les

fonctions des protéines correspondantes. Il s'agit essentiellement des gènes HLA dits de classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-Cw) et des gènes HLA dits de classe II (HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP). Ces gènes participent à la régulation de la réponse immunitaire au niveau de la surveillance de l'intégrité du soi, avec différentes conséquences dans le domaine médical. Une première application concerne le domaine des greffes d'organes ou de moelle osseuse, et de nombreux travaux ont démontré l'importance d'un appariement optimal entre le donneur d'organe(s) et le receveur, pour les gènes HLA impliqués donc dans l'histocompatibilité. Une seconde application concerne l'étude de la susceptibilité de chaque individu à développer certaines pathologies induites par des agents infectieux (virus, bactéries, parasites) ou par d'autres mécanismes encore mal connus (cas des maladies auto-immunes par exemple). Les gènes HLA participent alors au développement de la très grande diversité de la réponse immunitaire, observée au niveau de chaque individu, pour un groupe ethnique donné. Enfin, la détermination des allèles des gènes HLA permet une caractérisation ou identification précise de tout individu, constituant un troisième domaine d'application du typage HLA.

Une des difficultés principales du typage HLA réside dans l'homologie structurale observée pour ces gènes, ceux-ci ayant évolué à partir d'ancêtres communs. Il en résulte que les gènes d'intérêt sont à analyser au sein d'un ensemble de gènes fonctionnels proches, ou de gènes non fonctionnels (pseudogènes). Il est donc essentiel de maîtriser le mieux possible le ciblage de l'analyse des séquences nucléiques, en optimisant les techniques d'amplification des régions à séquencer.

Par exemple, le typage HLA-A repose sur l'analyse sélective des deux allèles du gène HLA-A observés chez un individu, en évitant l'analyse des gènes structurellement proches HLA-B et HLA-Cw. Il est donc essentiel de pouvoir amplifier spécifiquement les régions apparentées observées pour le gène HLA-A, en utilisant des amorces nucléotidiques capables de s'hybrider uniquement avec les régions ciblées sur ce gène.

Un autre exemple concerne le typage HLA-DR, où l'analyse du polymorphisme ne concerne que les gènes HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 et HLA-DRB5 qui correspondent aux gènes codant pour les chaînes polypeptidiques constituant les protéines fonctionnelles exprimées à la surface des cellules, en évitant la co-

amplification et l'analyse des pseudogènes HLA-DRB2, HLA-DRB6, HLA-DRB7, HLA-DRB8 et HLA-DRB9. L'exemple du typage HLA-DR illustre la grande complexité du mélange de séquences nucléiques à identifier rencontrées pour un échantillon donné, et la présence de deux allèles pour chacun des gènes accroît encore la difficulté, rendant parfois l'interprétation des résultats bien délicate (ambiguïtés de typage).

En prenant pour exemple le typage HLA-DR, il peut s'avérer que la simplification de l'analyse puisse être très bénéfique, en restreignant celle-ci uniquement à l'analyse du gène HLA-DRB1 (avec ses deux allèles pour chaque individu), si les techniques d'analyse moléculaire employées font appel à la détermination d'intensité de signaux (intensité de fluorescence pour des molécules de tailles croissantes pour le séquençage) ou à l'interprétation de profils de réactivité d'hybridation d'oligosondes, par exemple. Cet objectif peut être atteint en sélectionnant des amorces nucléotidiques d'amplification spécifiques HLA-DRB1, mais cette approche n'est pas toujours possible du fait des séquences nucléiques observées pour les différents allèles du gène HLA-DRB1 et des séquences des autres gènes HLA-DRB qui partagent une grande homologie. Une alternative consiste en la présente invention, et repose sur l'utilisation d'un mélange d'amorces spécifiques des gènes HLA-DRB mais non spécifiques du gène HLA-DRB1, et d'amorces bloquantes spécifiques des gènes HLA-DRB3, HLA-DRB4 et HLA-DRB5. Il en résulte donc une amplification sélective des gènes HLA-DRB1, permettant la détermination plus facile des deux allèles HLA-DRB1 observés pour un individu donné.

Les amorces nucléotidiques sont synthétisées selon les méthodes traditionnelles comme celles utilisant la synthèse en phase solide par exemple, et sauf indications contraires, comportent un résidu -OH en 3' sur le sucre (3'-OH) permettant leur élongation lors de l'étape d'amplification. Il s'agit essentiellement d'oligonucléotides de longueur comprise entre 10 et 30 mers, selon les applications, ceci dépendant des séquences nucléiques considérées.

Les amorces nucléotidiques bloquantes sont préparées selon les méthodes citées ci-dessus et contiennent un groupement fonctionnel, qui inhibe l'élongation, situé à l'extrémité 3' de l'oligonucléotide. L'objet de cette fonction bloquante est d'empêcher l'addition par la DNA polymérase, de la base suivante selon l'information lue sur la séquence complémentaire. A titre d'exemple, ce groupement fonctionnel bloquant en 3' peut être un groupement phosphate-alkylamine (C_n-NH_2), phosphate ou dabcyI, voir à ce sujet la figure 7. Ces groupements protègent la fonction hydroxyle (3'-OH) et bloquent ainsi sa réactivité lors de la polymérisation polynucléotidique catalysée par la DNA polymérase. Le blocage de la polymérisation enzymatique peut être aussi obtenu par déshydroxylation de la position 3'. En effet, des amorces contenant des extrémités 3'-H, 2'-OH peuvent être obtenues en utilisant des réactifs appropriés et la technique d'assemblage oligonucléotidique sur support solide.

Si l'utilisation d'une amorce bloquante non chevauchante avec l'amorce non bloquante doit être envisagée, il peut être avantageux de protéger également l'extrémité 5' de l'amorce bloquante, afin que celle-ci ne soit ni dégradée par l'activité exonucléase de la polymérase, ni déplacée lors de l'élongation de l'amorce non bloquante située plus en amont (plus en 5') de la région à amplifier. Pour cela, différentes modifications peuvent permettre de maintenir l'intégrité de l'amorce bloquante hybridée sur la séquence nucléique à inactiver. Plusieurs possibilités peuvent être citées à titre d'exemples : le noyau acridine, le diméthoxytrityle (DMT), le groupement thiophosphate, une séquence additionnelle "tige-boucle". De telles modifications sont bien représentées à la figure 8.

Le noyau acridine est un intercalant puissant, il confère ainsi au duplex amorce - séquence cible une très grande stabilité et évite le déplacement de l'amorce. Le diméthoxytrityle (DMT) utilisé comme groupement protecteur de l'extrémité 5'-hydroxyle, le groupement thiophosphate utilisé dans la stratégie antisens, et une séquence additionnelle capable de former une structure secondaire "tige-boucle" protègent l'amorce d'une éventuelle dégradation par une activité exonucléasique.

Modification en 3'	-C _n -NH ₂ -phosphate -H -dabcyl
Modification en 5'	-acridine -DMT -thiophosphate -structure « tige-boucle »

Tableau 1 : modifications des extrémités 3' (et) 5' des amorces bloquantes

5 Le principe d'utilisation de mélanges d'amorces non bloquantes et d'amorces bloquantes, peut être utilisé pour l'extrémité 3' (en aval), ou pour l'extrémité 3' et pour l'extrémité 5' (en amont de la région à analyser), selon les caractéristiques des séquences nucléiques ou selon la complexité des gènes de la région à analyser.

10 Cette approche d'amplification utilisant des amorces bloquantes peut aussi être appliquée pour des stratégies d'amplification simple correspondant à un mélange d'amorces capables de s'hybrider sur une même séquence nucléique à analyser, ou en multiplex correspondant à plusieurs mélanges d'amorces capables de s'hybrider lors d'une même réaction d'amplification sur différentes séquences nucléiques à analyser
15 (différents loci, différents gènes ou différentes régions de gène).

Exemple de synthèse d'amorces oligonucléotidiques bloquées en 3' et en 5'

20 Les amorces oligonucléotidiques bloquées ont été synthétisées sur un appareil Expidite (Perseptive Biosystems) selon la méthode au phosphoramidite par voie automatique conformément au protocole proposé par le constructeur. Les réactifs

phosphoramidites nécessaires à l'introduction des modifications en 3' et en 5' ont été obtenus de chez Glenn Research.

La purification des oligonucléotides est réalisée par HPLC en phase inverse (colonne semi-préparative Beckman ODS 10 mm x 25 cm; C18: 5 µm de porosité; éluant: gradient de 30 min de 10 à 30% d'acétonitrile en mélange avec une solution aqueuse d'acétate de triéthylammonium 0,1 M à pH 7). Les fractions contenant l'oligonucléotide sont collectées et séchées. Les différents oligonucléotides sont ensuite repris dans de l'eau pure et quantifiés par mesure de l'absorption UV.

Pour illustrer le principe de la présente invention, deux exemples d'application dans le domaine HLA sont décrits ci-après.

Exemple 1 : blocage spécifique de l'amplification du gène HLA-DRB3

Plusieurs gènes HLA-DRB peuvent coder pour une chaîne polypeptidique HLA-DRβ : HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 et HLA-DRB5. L'organisation de cet ensemble de gènes fonctionnels transmis de façon héréditaire, varie selon les individus, qui présentent donc différents haplotypes conservés. Si la présence d'un gène HLA-DRB1 est toujours observée, la présence de un ou deux autres gènes (HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5) est facultative, selon l'allèle HLA-DRB1 porté par le même chromosome. Par ailleurs, du fait de la présence des deux haplotypes (un hérité de la mère, l'autre du père), la complexité du mélange des séquences HLA-DRB à analyser est très variable. L'analyse de l'information principale associée aux allèles HLA-DRB1, peut donc être délicate à interpréter selon la présence ou non des autres gènes HLA-DRB, comme par exemple le HLA-DRB3. Il peut donc être avantageux de pouvoir amplifier tous les allèles possibles HLA-DRB1 (184 inscrits à la nomenclature de 1997, *Nomenclature for factors of the HLA system, 1996, Tissue Antigens, 49, 3-II, March 1997*) sans amplifier les allèles HLA-DRB3 éventuellement présents (1 ou 2 allèles possibles parmi les 11 allèles inscrits à la nomenclature de 1997).

Afin d'illustrer l'inhibition spécifique de l'amplification du gène DRB3, deux exemples sont décrits ci-après. le premier en utilisant un oligonucléotide comportant une extrémité 3' modifiée par incorporation d'un bras aminé (oligonucléotide 5858, SEQ ID 3) et le second en utilisant un oligonucléotide comportant une extrémité 3' modifiée comportant un -H et une extrémité 5' modifiée comportant une acridine (oligonucléotide 5967, SEQ ID 4).

Les ADN ont été extraits selon les techniques classiques de lyse cellulaire, de digestion par la protéinase K, puis purifiés par précipitation éthanolique après extraction phénolique. Les solutions d'ADN (concentration ajustée à 100 ng/μl en H₂O) sont conservées à 2-8°C.

Les conditions générales d'amplification utilisées ont été les suivantes :

- Tampon X10	: 10 μl
- amorce 5' générique (5867, SEQ ID NO 1) (10μM) (0.1μM final)	: 1 μl
- amorce 5' bloquante (10μM) (0 à 1.2μM final)	: 0 à 12 μl
- amorce 3' générique (P2, SEQ ID NO 2) (10μM) (0,1μM final)	: 1 μl
- dNTP (20mM) (0.2mM final)	: 1 μl
- Taq polymerase (5UI/μl) (1,5U)	: 0,3 μl
- ADN (100ng/μl) (100ng)	: 1 μl
- H ₂ O (QSP)	: 100 μl

Les caractéristiques du programme d'amplification utilisé avec un appareil Perkin Elmer GeneAmp 9600, ont été les suivantes :

2 min à 95°C (1 cycle)
 30 sec à 95°C + 30 sec à 55°C + 30 sec à 72°C (32 cycles)
 7 min à 72°C (1 cycle)

Les produits d'amplification obtenus ont été contrôlés en analysant une partie aliquote (5μl) par électrophorèse en gel d'agarose puis coloration au bromure d'éthidium. Après ce contrôle, les amplicons préparés ont été analysés avec le coffret

bioMérieux de typage HLA-DR oligodetection (réf. 74 500). Ce test permet de déterminer le typage HLA-DR par technique d'hybridation reverse en microplaques, par détection et analyse des allèles HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 et HLA-DRB5 (PCT/FR92/00702).

5 **Blocage DRB3 avec oligo 5'-phosphate / 3'-C₆-NH₂ :**

ADN : lignée OMW (ECCAC 9058), DRB1*1301, DRB3*01

Amorce HLA-DRB générique 5' (oligonucléotide 5867, SEQ ID NO 1) : 0.1 µM final

Amorce HLA-DRB générique 3' (oligonucléotide P2, SEQ ID NO 2) : 0.1 µM final

10 Amorce HLA-DRB3 bloquante 5' (oligonucléotide 5858, SEQ ID NO 3) : 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 µM final

Hybridation en microplaque :

15 Les valeurs des signaux d'hybridation (densité optique lue à 492 nm x1000) observées pour chacune des sondes spécifiques, sont reportées dans le tableau 2 ci-dessous.

Conc. finale d'amorce bloquante 5858 (µM)	Sonde 13	Sonde 3+6	Sonde 52a
0	> 2500	723	928
0.3	2109	578	101
0.6	1901	563	29
0.9	1759	374	31
1.2	1719	503	12
Ratio 0.6 / 0	0.76	0.78	0.03

20 Tableau 2 : signaux d'hybridation de l'amorce bloquante 5858 à différentes séquences cibles en fonction de sa concentration

Le calcul du ratio de la valeur lue pour 0.6 μ M par rapport à la valeur lue sans blocage, permet d'apprécier l'inhibition de l'amplification du gène DRB3.

Les sondes 13 et 3+6 sont spécifiques du gène DRB1, et la sonde 52a est spécifique du gène DRB3. L'addition d'oligonucléotide 5858 lors de l'amplification, inhibe l'amplification du gène DRB3, sans affecter l'amplification du gène DRB1. Cette inhibition est dose dépendante, et l'inhibition totale est observée pour une concentration d'oligonucléotide DRB3 bloquant de 0.6 μ M et plus.

Séquençage :

Les produits d'amplification obtenus avec ou sans blocage du gène DRB3, ont été séquencés en utilisant le kit ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (perkin-Elmer réf. 4303152). Les électrophorégrammes de la réaction Reverse sont reportés ci-après, pour l'essai sans blocage et pour l'essai avec blocage par 0.9 μ M d'oligonucléotide 5858.

Le montage des électrophorégrammes concernant la région codant pour les acides aminés 56 à 65 (Nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB, illustre l'inhibition de l'amplification du gène HLA-DRB3 (Figures 9 et 10).

Séquence attendue pour	5' > 3'											
	56			60			65					
DRB1*1301	CCT	GAT	GCC	GAG	TAC	TGG	AAC	AGC	CAG	AAG	GAC	
DRB3*01	CCT	GTC	GCC	GAG	TCC	TGG	AAC	AGC	CAG	AAG	GAC	
DRB1*1301+DRB3*01 (forward)	CCT	GWY	GCC	GAG	TMC	TGG	AAC	AGC	CAG	AAG	GAC	
DRB1*1301+DRB3*01 (reverse)	GGA	CWR	CGG	CTC	AKG	ACC	TTG	TCG	GTC	TTC	CTG	
Séquence lue pour												
essai sans blocage	GGA	CWR	CGG	CTC	AKG	ACC	TTG	TCG	GTC	TTC	CTG	
essai avec blocage (0.9 μM)	GGA	CTA	CGG	CTC	ATG	ACC	TTG	TCG	GTC	TTC	CTG	

Ainsi, l'addition d'amorce bloquante spécifique DRB3 (oligonucléotide 5858, 3'-C₆-NH₂) inhibe l'amplification du gène DRB3 comme le montre la disparition des bases apparentées en position 57 et 60, démontrant l'absence de la séquence correspondant à l'allèle DRB3*01.

5

Blocage DRB3 avec oligonucléotide 5'-acridine / 3'-H

ADN : lignée OMW (ECCAC 9058), DRB1*1301, DRB3*01

Amorce HLA-DRB générique 5' (oligonucléotide 5867, SEQ ID NO 1) : 0.1 µM final

10 Amorce HLA-DRB générique 3' (oligonucléotide P2, SEQ ID NO 2) : 0.1 µM final

Amorce HLA-DRB3 bloquante 5' (oligonucléotide 5967, SEQ ID NO 4) : 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 µM final

Hybridation en microplaque :

15

Les valeurs des signaux d'hybridation (densité optique lue à 492 nm x1000) observées pour chacune des sondes spécifiques, sont reportées dans le tableau 3 ci-dessous.

Conc. finale d'amorce bloquante 5967 (µM)	Sonde 13	Sonde 3+6	Sonde 52a
0	2356	907	893
0.3	1227	251	5
0.6	1395	239	0
0.9	799	185	4
1.2	965	161	0
Ratio 0.6 / 0	0.60	0.30	0

20

Tableau 3 : signaux d'hybridation de l'amorce bloquante 5967 à différentes séquences cibles en fonction de sa concentration

Le calcul du ratio de la valeur lue pour 0.6 μ M / la valeur lue sans blocage, permet d'apprécier l'inhibition de l'amplification du gène DRB3.

5 Là encore, l'addition d'oligonucléotide 5967 lors de l'amplification, inhibe l'amplification du gène DRB3, sans affecter l'amplification du gène DRB1. Cette inhibition est dose dépendante, et l'inhibition totale est observée pour une concentration d'oligonucléotide DRB3 bloquant de 0.3 μ M et plus.

10 Exemple 2 : blocage spécifique de l'amplification du gène HLA-DRB4

La situation est comparable à celle décrite dans l'exemple 1. Afin de simplifier l'interprétation du typage HLA-DRB1, il peut être avantageux de limiter l'amplification HLA-DRB avec les amorces HLA-DRB génériques, au gène DRB1, sans co-
15 amplification du gène DRB4. La présente invention décrit l'utilisation d'amorces spécifiques DRB4 bloquantes.

Les protocoles expérimentaux sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 1.
ADN : lignée T7526 (ECCAC 9076), DRB1* 0901, DRB4*01
20 Amorce HLA-DRB générique 5' (oligonucléotide 5867, SEQ ID NO 1) : 0.1 μ M final
 Amorce HLA-DRB générique 3' (oligonucléotide P2, SEQ ID NO 2) : 0.1 μ M final
 Amorce HLA-DRB4 bloquante 5' (oligonucléotide 5965, SEQ ID NO 5) : 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 μ M final

25 Hybridation en microplaque :

Les valeurs des signaux d'hybridation (densité optique lue à 492 nm x1000) observées pour chacune des sondes spécifiques, sont reportées dans le tableau 4 ci-dessous.

Conc. finale d'amorce bloquante 5965 (μM)	Sonde 9	Sonde 53
0	1769	1320
0.3	1935	110
0.6	1754	41
0.9	1750	29
1.2	1516	14

Ratio 0.6 / 0	0.99	0.03
---------------	------	------

Tableau 4 : signaux d'hybridation de l'amorce bloquante 5965 à différentes séquences cibles en fonction de sa concentration

5 Le calcul du ratio de la valeur lue pour 0.6 μM / la valeur lue sans blocage, permet d'apprécier l'inhibition de l'amplification du gène DRB4.

10 La sonde 9 est spécifique du gène DRB1, et la sonde 53 est spécifique du gène DRB4. L'addition d'oligonucléotide 5965 lors de l'amplification, inhibe l'amplification du gène DRB4, sans affecter l'amplification du gène DRB1. Cette inhibition est dose dépendante, et l'inhibition totale est observée pour une concentration d'oligonucléotide DRB4 bloquant de 0.6 μM et plus.

Séquençage :

15

Les produits d'amplification obtenus avec ou sans blocage du gène DRB4, ont été séquencés en utilisant le kit ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (perkin-Elmer réf. 4303152). Les électrophorégrammes de la réaction Reverse sont reportés ci-après, pour l'essai sans blocage et pour l'essai avec blocage par 0.9 μM d'oligonucléotide 5965.

20

Le montage des électrophorégrammes concernant la région codant pour les acides aminés 29 à 47 (Nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB, illustre l'inhibition de l'amplification du gène HLA-DRB4 (Figures 11 et 12).

Séquence attendue pour	5' > 3'																			
	30					35					40					45				
DRB1*0901	AGA	GGC	ATC	TAT	AAC	CAA	GAG	GAG	AAC	GTG	CGC	TTC	GAC	AGC	GAC	GTG	GGG	GAG	TAC	
DRB4*01	AGA	TAC	ATC	TAT	AAC	CAA	GAG	GAG	TAC	GCG	CGC	TAC	AAC	AGT	GAC	CTG	GGG	GAG	TAC	
DRB1*0901+DRB4*01 (forward)	AGA	KRC	ATC	TAT	AAC	CAA	GAG	GAG	WAC	GYG	CGC	TWC	RAC	AGY	GAC	STG	GGG	GAG	TAC	
DRB1*0901+DRB4*01 (reverse)	TCT	MYG	TAG	ATA	TTG	GTT	CTC	CTC	WTG	CRC	GCG	AWG	YTG	TCR	CTG	SAC	CCC	CTC	ATG	
Séquence lue pour																				
essai sans blocage	TCT	MYG	TAG	ATA	TTG	GTT	CTC	CTC	WTG	CRC	GCG	AWG	YTG	TCR	CTG	SAC	CCC	CTC	ATG	
essai avec blocage (0.9 µM)	TCT	CCG	TAG	ATA	TTG	GTT	CTC	CTC	TTG	CAC	GCG	AAG	CTG	TCG	CTG	CAC	CCC	CTC	ATG	

5

Ainsi, l'addition d'amorce bloquante spécifique DRB4 (oligonucléotide 5965, 3'-C₆-NH₂) inhibe l'amplification du gène DRB4 comme le montre la disparition des bases apparentées en positions 30, 37, 38, 40, 41, 42 et 44, démontrant l'absence de la séquence correspondant à l'allèle DRB4*01.

10 La présente invention peut être appliquée au typage HLA-DRB1 de haute résolution, le blocage spécifique de l'amplification spécifique des gènes HLA-DRB3, -DRB4, -DRB5 et des pseudogènes HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8 et -DRB9 par l'utilisation d'amorces bloquantes réduisant l'analyse à un mélange de une (cas d'un échantillon homozygote) ou de deux séquences nucléotidiques (cas d'un échantillon

15 hétérozygote). Une telle stratégie utilise des amorces bloquantes HLA-DRB3 spécifiques (oligonucléotides 5816 (SEQ ID NO 6), 5868 (SEQ ID NO 7), 5885 (SEQ ID NO 8) à titre d'exemples), des amorces HLA-DRB4 spécifiques (oligonucléotides 5883 (SEQ ID NO 9), 5916 (SEQ ID NO 10), 5917 (SEQ ID NO 11) à titre d'exemples) et des amorces HLA-DRB5 spécifiques (oligonucléotides 5021 (SEQ ID

20 NO 12), 5870 (SEQ ID NO 13), 5871 (SEQ ID NO 14), 5881 (SEQ ID NO 15), 5902 (SEQ ID NO 16), 5903 (SEQ ID NO 17), 5913 (SEQ ID NO 18), 5914 (SEQ ID NO 19) à titre d'exemples), modifiés en leurs extrémités 3' et 5' comme décrit plus haut.

Un blocage complet des gènes HLA-DRB3, -DRB4 et -DRB5 peut être réalisé en utilisant un mélange d'amorces bloquantes.

Dans le tableau 5 qui suit, i représente l'inosine.

Référence bioMérieux	SEQ ID NO	Séquence nucléotidique (5' > 3')	Modif ^o en 5'	Modif ^o en 3'
5867	1	ATC CTT CGT GTC CCC ACA GCA CG	-	-
P2	2	TCG CCG CTG CAC TGT GAA G	-	-
5858	3	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-	C ₆ -NH ₂
5967	4	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-acridine	-H
5965	5	CCC ACA GCA CGT TTC TTG GAG Cai GC	-	..C ₆ -NH ₂
5816	6	CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-	-
5868	7	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-	-
5885	8	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GiT	-	-
5883	9	CAT TTC CTC AAT GGG ACG GAG iiA	-	-
5916	10	CCC CCA GCA CGT TTC TTG GAG Cai GC	-	-
5917	11	CCC ACA GCA CGT TTC TTG GAG Cai GC	-	-
5021	12	CA CGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5870	13	CA GCA CGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5871	14	CA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5881	15	CA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5902	16	CCC CCA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5903	17	CCC ACA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5913	18	CCC ACA GCA iGT TTC TTG CAG CAG iA	-	-
5914	19	CCC CCA GCA iGT TTC TTG CAG CAG iA	-	-

Tableau 5 : séquence nucléotidique des oligonucléotides utilisés comme
amorces pour l'amplification

5

L'inosine, base non naturelle, est utilisée afin de fragiliser l'hybride acide nucléique - amorce de blocage. En effet, l'inosine est relié à son nucléotide

complémentaire par deux liaisons hydrogènes et donc lorsqu'on la substitue à une pyrimidine, la liaison entre les deux brins, à son niveau, est plus faible. Un gène pouvant varier d'autres gènes apparentés par une seule base, il est intéressant de substituer sur l'amorce de blocage, complémentaire du gène, les bases autour de cette position cruciale par des inosines. Le duplex acide nucléique - amorce de blocage devenant ainsi fragilisé, il ne peut y avoir hybridation que si l'amorce est parfaitement complémentaire de la séquence génique cible. On renforce ainsi la spécificité de l'amorce de blocage.

La présente invention concerne donc un procédé d'amplification sélective de gènes présents dans un mélange de gènes apparentés, par utilisation d'amorces oligonucléotidiques bloquantes correspondant à des oligonucléotides comportant une extrémité 3' modifiée ne permettant pas leur élongation lors des étapes d'amplification enzymatique des gènes cibles.

L'invention concerne également l'utilisation d'amorces bloquantes au sens décrit dans la revendication 1, comportant une extrémité 5' modifiée ne permettant pas leur déplacement ou leur dégradation, lors des étapes d'amplification enzymatique des gènes cibles par une amorce spécifique d'une région située plus en 5' sur le même gène.

Dans le cas d'une utilisation d'amorces bloquantes au sens décrit ci-dessus la modification à l'extrémité 5' est facultative. Ainsi, deux possibilités différentes existent.

Selon un premier mode d'utilisation, le groupement -OH en 3' est remplacé par un groupement naturellement non trouvé dans la nature, comme un groupement -H, -phosphate, -dabcyl, ou une chaîne carbonée terminée par un groupement -NH₂, à titre d'exemples.

Selon un second mode d'utilisation, le groupement -phosphate en 5' est remplacé par un groupement naturellement non trouvé dans la nature, comme un groupement -DMT, acridine, -thiophosphate, ou une structure « tige-boucle », à titre d'exemples.

Les amorces bloquantes, telles que décrites ci-dessus, peuvent aussi comporter des modifications de l'oligonucléotide en position non terminale et sont utilisées afin de favoriser leur hybridation sur leurs séquences cibles.

Les amorces bloquantes, telles que décrites ci-dessus, sont capables de s'hybrider sur le brin codant ou sur le brin complémentaire (utilisation d'amorces bloquantes 5' ou d'amorces bloquantes 3').

Il est également possible d'utiliser une amorce bloquante ou un mélange
5 d'amorces bloquantes.

L'utilisation d'amorces bloquantes est particulièrement intéressante pour les méthodes d'amplification des séquences cibles, comme par exemple la PCR, la TMA ou tout autre technique.

L'invention concerne enfin l'utilisation d'une ou de plusieurs amorces
10 bloquantes pour l'inhibition de l'amplification des gènes HLA-DRB3, -DRB4 et -DRB5, choisies parmi celles qui sont définies par les séquences suivantes, et leurs complémentaires :

- CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT
- CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT
- 15 - CCC ACA GCA CGT TTC TTG GAG CAi GC
- CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT
- CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT
- CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GiT
- CAT TTC CTC AAT GGG ACG GAG iiA
- 20 - CCC CCA GCA CGT TTC TTG GAG CAi GC
- CCC ACA GCA CGT TTC TTG GAG CAi GC
- CA CGT TTC TTG CAG CAG GA
- CA GCA CGT TTC TTG CAG CAG GA
- CA iGT TTC TTG CAG CAG GA
- 25 - CA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA
- CCC CCA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA
- CCC ACA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA
- CCC ACA GCA iGT TTC TTG CAG CAG iA
- CCC CCA GCA iGT TTC TTG CAG CAG iA

REVENDICATIONS

1. Procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière d'un acide nucléique de synthèse ou naturel contenu dans un mélange réactionnel, le
 5 mélange réactionnel étant constitué d'au moins un acide nucléique comportant au moins deux séquences nucléotidiques apparentées et/ou d'au moins deux acides nucléiques comportant chacun au moins une séquence nucléotidique apparentée ; le procédé utilisant au moins un type d'amorces d'amplification capables de s'hybrider avec l'acide nucléique pour permettre l'amplification des séquences nucléotidiques
 10 apparentées, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter, dans le mélange réactionnel, au moins une séquence, faisant office d'amorce de blocage, qui est capable :

- de s'hybrider à au moins une séquence nucléotidique, qui n'est pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier, et

- d'empêcher à son niveau l'élongation de l'amorce d'amplification.

15

2. Procédé, selon la revendication 1, caractérisé en ce que la ou les amorces de blocage sont capables de s'hybrider à la ou à toutes les séquences nucléotidiques, qui ne sont pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier.

20 3. Amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée par le fait que chaque amorce de blocage est un oligonucléotide à base de désoxyribonucléotides et/ou de ribonucléotides et/ou de nucléotides modifiés, tels que des PNA ou des nucléotides thiophosphates.

25 4. Amorce, selon la revendication 3, caractérisée par le fait que chaque amorce de blocage comporte au moins un élément qui empêche l'amplification.

30 5. Amorce, selon la revendication 4, caractérisée par le fait que l'élément, qui empêche l'amplification, est situé à l'extrémité 3' de l'amorce de blocage et ne permet pas son élongation.

6. Amorce, selon la revendication 5, caractérisée par le fait que l'élément, qui empêche l'amplification, est situé à l'extrémité 5' de l'amorce de blocage et fait office d'élément protecteur.

5 7. Amorce, selon l'une des revendications 4 à 6, caractérisée par le fait que chaque élément, qui empêche l'amplification, est constitué par un nucléotide ou nucléotide modifié ou par un oligonucléotide comportant ou non au moins un nucléotide modifié : le nucléotide, le nucléotide modifié ou l'oligonucléotide ne s'hybride pas sur l'acide nucléique.

10

8. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisée par le fait que chaque élément, qui empêche l'amplification, est constitué par une molécule, différente d'un nucléotide ou d'un nucléotide modifié.

15

9. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisée par le fait que l'élément est constitué par au moins cinq, notamment au moins dix et préférentiellement au moins quinze nucléotides, nucléotides modifiés ou un mélange de nucléotide(s) et de nucléotide(s) modifié(s).

20

10. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 4 à 7 ou 9, caractérisée par le fait que l'élément est suffisamment long pour permettre la formation d'une boucle et d'une hybridation entre les nucléotides et/ou les nucléotides modifiés, qui constituent cette boucle.

25

11. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 4 à 7 ou 9, caractérisée par le fait que l'élément est constitué d'une "queue" de polynucléotides et/ou de polynucléotides modifiés, qui comporte tous les mêmes bases.

12. Amorce dans laquelle l'élément ne permet pas l'élongation, selon l'une quelconque des revendications 4, 5 ou 7 à 11, caractérisée par le fait que l'élément substitué à l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle ou du groupement hydroxyle, placé en position 3' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 3' de l'acide nucléique.

13. Amorce dans laquelle l'élément est protecteur, selon l'une quelconque des revendications 4, 6 à 12, caractérisée par le fait que l'élément est :

- substitué au phosphate, placé en position 5' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 5' de l'acide nucléique, ou
- greffé sur le phosphate, placé en position 5' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 5' de l'acide nucléique.

1/7

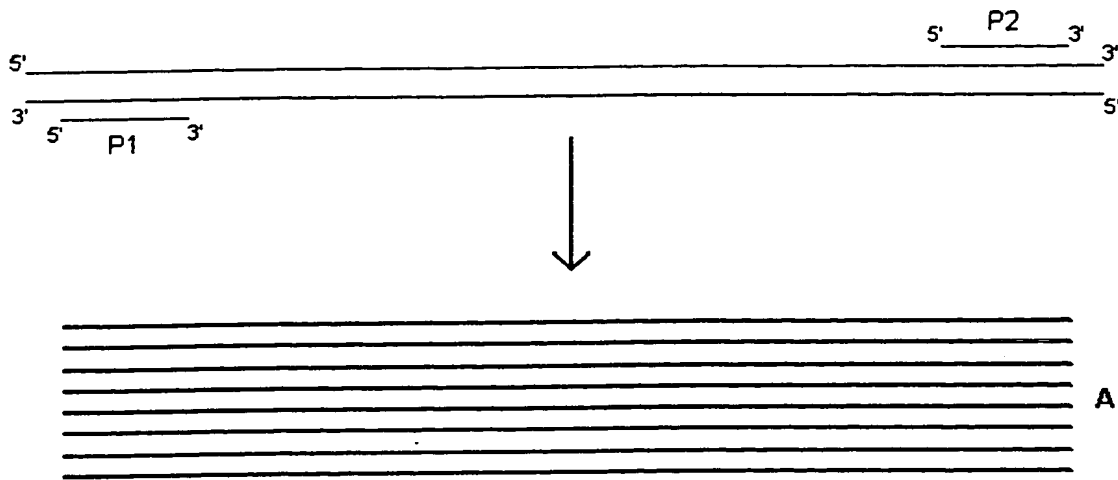


Fig. 1

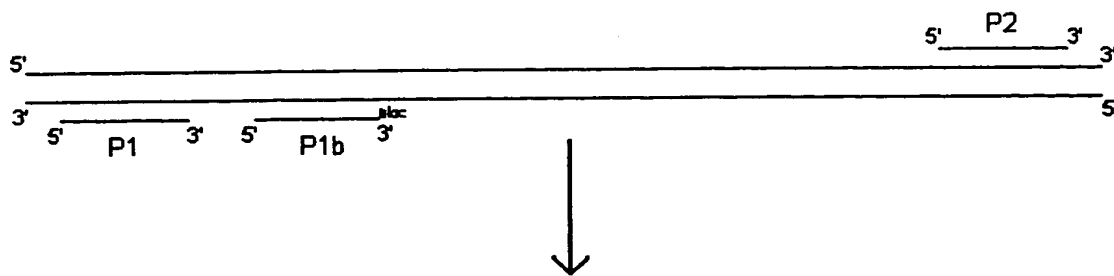


Fig. 2

Fig. 3Fig. 4Fig. 5Fig. 6

3/7

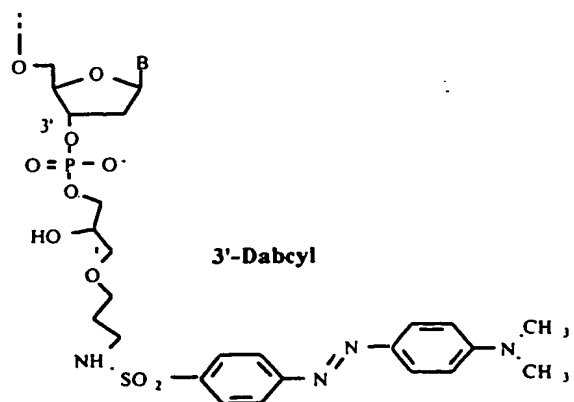
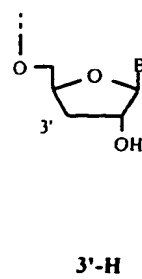
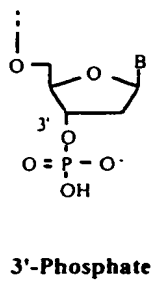
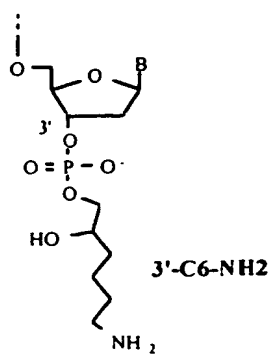


Fig. 7

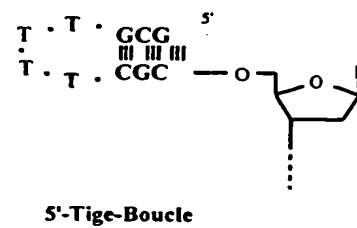
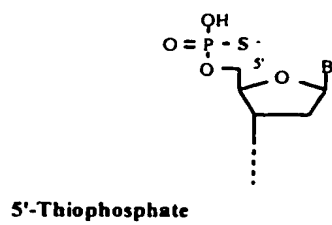
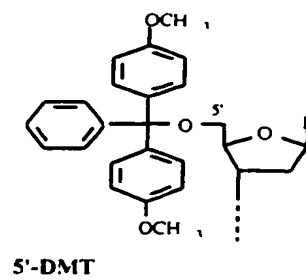
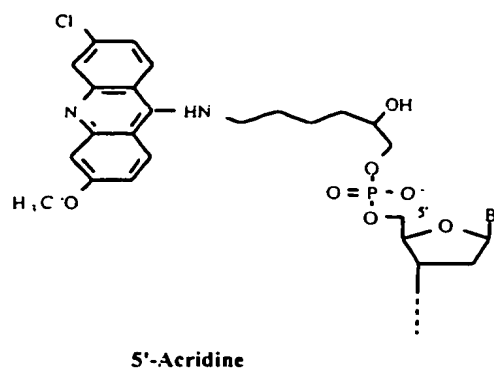
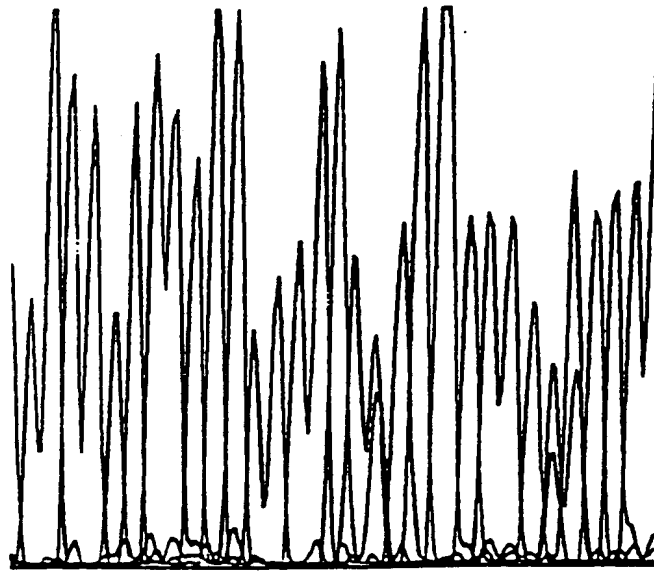


Fig. 8



3' TCCTTCTGGCTGTTCCAGTACTCGGCATCAGG 5'

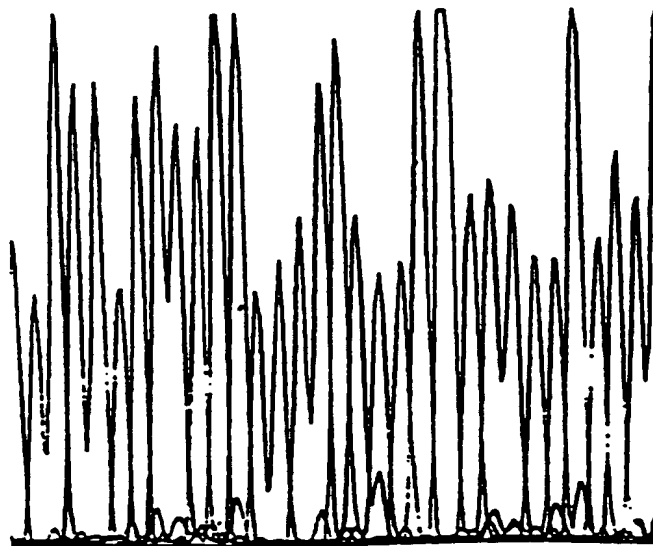


Fig. 10

3' GTACACCCCGGTTACTCCCECCASGTCNCCTGTGTGWAACGCGCGTWCCTCCCTCTTGGTTATAGATGTCCTG 5'

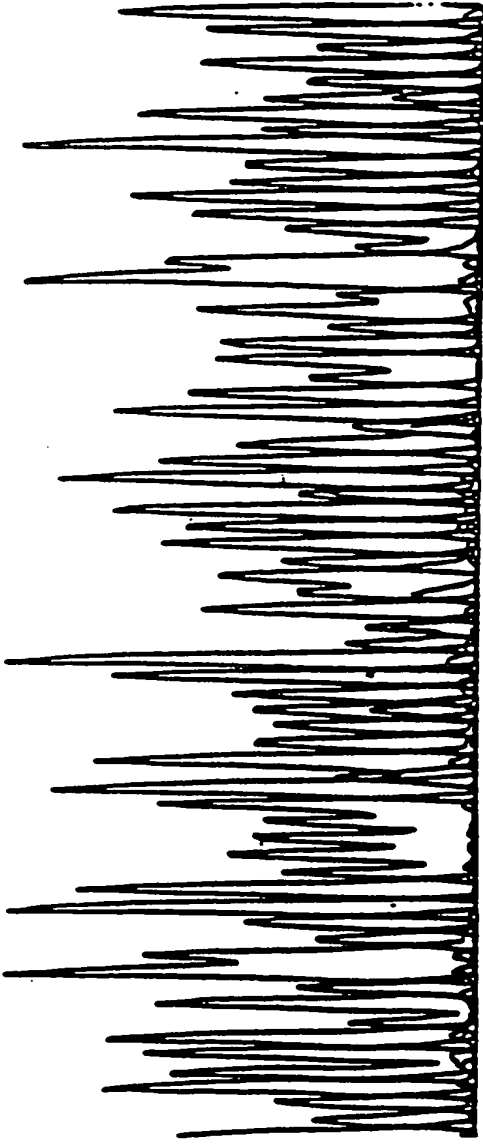


Fig. 11

3' GTACCCGCCCGTACTCCCCCACGTCGCTGTGCAAGCCGACAGTTCCTCCTTGTGTTATAGATGCGCTCTG 5'

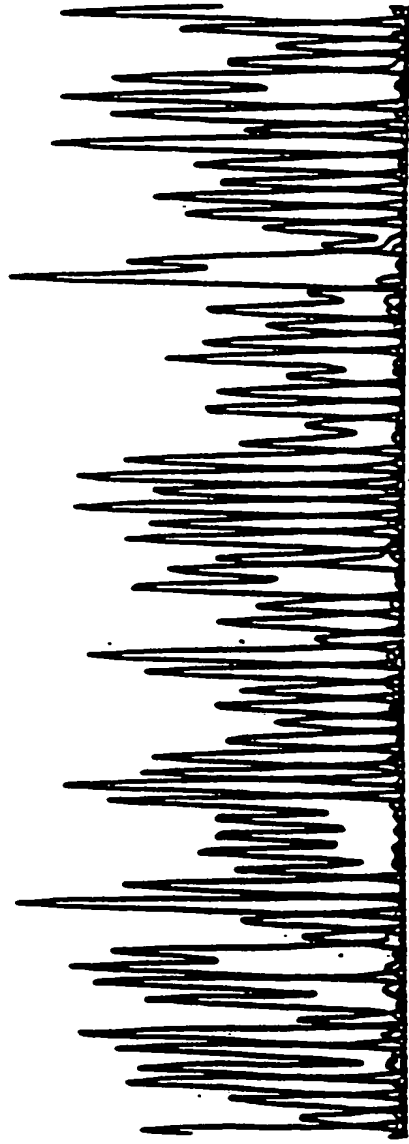
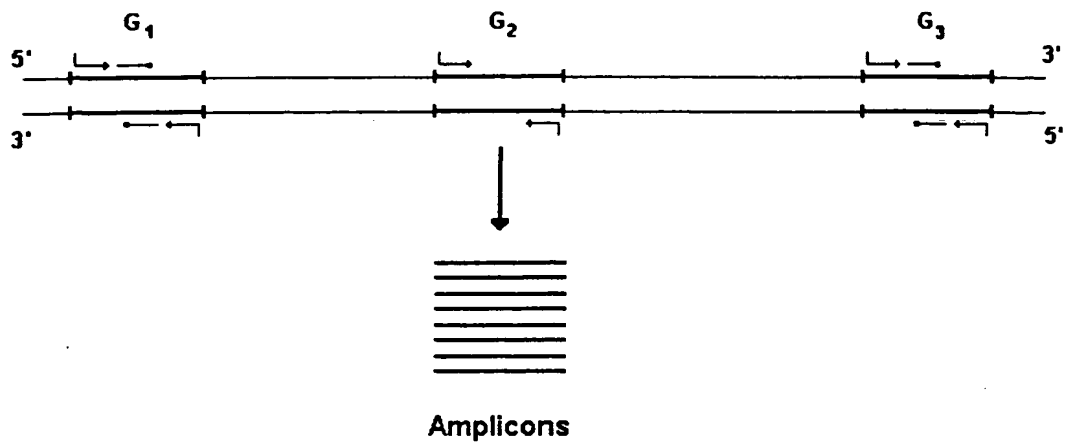


Fig. 12



↪ Amorce d'amplification

↠ Amorce bloquante

Fig. 13